

Возрождение запаха

И. Гутерман



*Инна Гутерман
12-й выпуск (Школа
Лобачевского), школа
№ 520 (1990 г.), закончила
Московский Институт тон-
кой химической технологии
(1996 г.), к.б.н., научный
сотрудник в Университете
Йорка (Великобритания),
inna.guterma@gmail.com*

Очень давно, когда я еще жила в Москве, мне иногда дарили розы. Их можно было купить даже зимой, в мороз. Продавцы тогда прятали все цветы в такие стеклянные аквариумы и в них жгли для обогрева свечи. Розы были бордовые на высоких толстых и очень колючих стеблях. Форма бутона и цвет — все было прекрасно, и стояли розы в вазе на удивление долго. До полного совершенства им не хватало только одного маленького, но важного штриха — запаха.

Через несколько лет, уже совсем в другой стране, мне вновь пришлось столкнуться с розами. Они предстали передо мной совсем в иной роли — объекта исследования. Я искала работу и пришла в Иерусалимский университет на факультет сельского хозяйства, где мне предложили делать диссертацию на тему «Геномика лепестков роз: идентификация и изучение новых генов, формирующих запах роз». Тема звучала весьма романтически и мне понравилась. Итак, можно ли вернуть розам их нежный аромат?

Что такое цветочный запах?

Большинство растений способны воздействовать на рецепторы человека, вызывая определенные обонятельные ощущения. Химическое различие между «приятным» и «неприятным» запахом может быть очень незначительным. При этом композиции одних и тех же веществ, взятых в различных концентрациях, могут ассоциироваться с совершенно различными запахами. Вещества, обладающие запахом, являются легко летучими, липофильными, легко диффундируют через мембрану и испаряются в атмосферу. Известно уже более 1000 летучих веществ (ЛВ),

синтезируемых растениями, и это количество увеличивается, поскольку появляются новые, более чувствительные, методы анализа ЛВ.

ЛВ синтезируются не только различными частями цветка, но и вегетативными частями растения (листьями, корнями и стеблем). Запахом могут обладать также и плоды растения. Спектр выделяемых веществ изменяется в зависимости от стадии развития, времени суток, а также от воздействий на растение в целом (например, стресс или повреждение).

ЛВ растений относят к группе так называемых вторичных метаболитов, названных так потому, что они, в отличие от первичных метаболитов, не являются универсальными веществами, необходимыми для жизнедеятельности всех растений. Вторичные метаболиты служат для привлечения насекомых-опылителей, многие из них синтезируются в ответ на повреждение растения и являются токсичными для патогенных бактерий, грибов и других вредителей; известны также вещества, которые могут подавлять рост соседних растений. В плодах вторичные метаболиты играют роль консервантов, а также являются сигналом (вкус, цвет, запах) для животных, употребляющих данные плоды в пищу и осуществляющих таким образом распространение семян. Некоторые специфические вещества синтезируются растениями в ответ на стресс, например в условиях засухи или повышенного содержания в почве солей.

Химический состав запаха

Несмотря на все разнообразие растительных ЛВ, большинство их относится к трем основным группам: терпены, фенилпропаноиды/бензеноиды и производные жирных кислот.

Терпены являются производными изопрена и в зависимости от количества изопреновых звеньев подразделяются на моно-, ди- (гиббереллины), три- (стероиды), сескви- и тетратерпены (каротиноиды). Всего известно более 20 000 терпенов, более половины которых обнаружены в растениях. Не все терпены летучи, компонентами запаха в основном являются моно-, ди- и сесквитерпены. Большинство растительных терпенов — вторичные метаболиты. Терпены гиббереллин и абсцизовая кислота — фитогормоны и

относятся к «первичным метаболитам». Предшественником всех растительных терпенов является изопентенил дифосфат (IPP), который синтезируется как в цитоплазме (acetate/mevalonate pathway), так и в пластидах (pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate pathway).

Фенилпропаноиды (включая и бензеноиды) являются производными фенилаланина (L-Phe). Путь биосинтеза фенилпропаноидов пока не полностью изучен. Ключевым ферментом биосинтеза фенилаланина является фенилаланин аммоний-лиаза (PAL), дальнейшие превращения включают в себя реакции гидроксирования, метилирования и ацетилирования.

Летучие спирты и альдегиды образуются в результате деградации фосфолипидов и жирных кислот под действием липоксигеназ, гидропероксидаз, изомераз и дегидрогеназ.

Как собрать запах?

Для изучения химического состава запаха используются в основном различные хроматографические методы. Особенно часто применяют газовые или жидкостные хроматографы в сочетании с масс-спектрометрией (GC-MS или LC/MS).

Уже в Древнем Египте использовали ароматические масляные экстракты, которые изготавливали из различных трав и цветов. В современном варианте в качестве растворителя используют спирт, хлороформ и некоторые другие органические растворители. Существенным недостатком полученного экстракта является то, что кроме пахучих веществ в него попадают другие химические компоненты, причем в концентрациях, превышающих концентрации ЛВ в десятки, а иногда и сотни раз. Анализ такой смеси хроматографическими методами — задача весьма затруднительная.

Для изучения запаха больше подходят методы, позволяющие уловить и сконцентрировать именно легколетучие вещества, так называемый «анализ свободного пространства» (headspace). Например, метод твердофазной микроэкстракции (SPME) использует свойство определенных полимеров поглощать запахи. Тонкий стержень из такого полимерного материала инкубируют в плотно закрытом сосуде вместе с растением в течение 10–30 минут. Затем стержень вынимают и помещают в инжектор хроматографической колонки, где он нагревается до температуры 200–250 °С. При нагреве адсорбированные полимером молекулы высвобождаются и попадают в колонку, где тем или иным способом подвергаются фракционированию. Метод этот хорош

своей высокой чувствительностью, а также быстротой и простотой использования. Однако есть у него и определенные недостатки: из-за избирательности процесса адсорбции нельзя судить о количествах компонентов в анализируемой смеси, кроме того, на полимер могут адсорбироваться и совсем посторонние молекулы, например те, которые находились в помещении, где проводился анализ.

Название другого метода в буквальном переводе с английского звучит как «ловушка» (trapping). Метод заключается в том, что растение или какую-то его часть помещают в закрытый сосуд, через который с помощью насоса медленно прокачивается воздух. Подача воздуха осуществляется через фильтр. Запах адсорбируется на другом фильтре, который находится на выходе из сосуда. Для сбора запаха используют специальные полимеры. После окончания эксперимента полимер промывают растворителем (например, гексаном) и таким образом получают «экстракт чистого запаха». Этот метод позволяет судить не только о качественном, но и количественном составе запаха, а также сравнивать состав запаха, выделяемого растением в определенном промежутке времени (например, сравнить состав веществ, выделяемых одним и тем же растением в течение дня и ночи).

На каких растениях изучают запах?

В течение многих лет исследование запаха сводилось в основном к изучению химической структуры пахучих веществ и налаживанию их синтеза в промышленных количествах для применения в косметической и пищевой промышленности. При этом биохимические пути синтеза и механизмы регуляции выделения ЛВ до недавних пор не были объектом пристального изучения (Shalit *et al.*, 2003). Возможно, основной причиной такого невнимания было отсутствие методов, позволяющих регистрировать и определять компоненты запаха *in vivo*. Кроме того, использование наиболее популярного среди растительных биологов модельного растения *Arabidopsis thaliana* до недавнего времени казалось невозможным. Для молекулярных биологов арабидопсис представляет собой почти идеальную модель: высокоплодовитое, миниатюрное растение с небольшим по размеру геномом (5 хромосом общим размером 125 млн пар оснований) и коротким (около 6 недель от прорастания до зрелого семени) жизненным циклом является удобным для классического мутационного и генетического анализа. Геном *Arabidopsis* был полностью секвенирован еще в 2000 г.

Метод трансформации — внедрения в растение чужеродных генов — для арабидопсиса значительно проще и эффективнее, чем для всех остальных растений. Существует база данных <http://www.arabidopsis.org/>, в которой можно найти очень много информации, а также заказать семена. К сожалению, запах у арабидопсиса слабый, и только в 2003 г. ученым удалось проанализировать его состав методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и установить, что более 60% выделяемых арабидопсисом летучих веществ относятся к группе терпеноидов. Таким образом, многие важные составляющие запаха других растений, а следовательно и гены, регулирующие выработку этих веществ, у арабидопсиса отсутствуют.

При сравнении данных о количестве секвенированных растительных транскриптов (см. сайт http://plantta.tigr.org/cgi-bin/plantta_release.pl) становится понятно, что и другие интенсивно изучаемые растения — рис, пшеница, картофель, помидоры, кукуруза — не могут являться хорошей моделью для экспериментов с запахом. Для исследования ЛВ используются менее «популярные», но обладающие более сильным запахом растения: кларкия Бревери (*Clarkia breweri*), львиный зев (*Antirrhinum majus*), садовая петуния (*Petunia × hybrida*), клубника (*Fragaria × ananassa*). В последние годы особенно модным стал глобальный подход, позволяющий работать с такими «непопулярными» растениями. Этот подход получил название «OMICS» и происходит от терминов геномика (genomics), транскриптомика (transcriptomics), протеомика (proteomics) и метаболомика (metabolomics). Геномика позволяет изучить геном организма в целом, транскриптомика определяет, какие гены экспрессируются в заданный момент времени, протеомика дает информацию о белках, а метаболомика составляет профайл метаболитов. Соотнесение этих данных дает возможность идентифицировать новые гены и определить функции уже известных.

Можно ли вернуть улетучившийся запах?

Садовые розы (*Rosa × hybrida*) обладают сильным запахом, химический состав которого включает весь спектр растительных ЛВ: терпены, фенилпропаноиды и производные жирных кислот. Интересен тот факт, что большинство роз, предназначенных для срезания, хотя и не увядают долго, не обладают классическим «розовым» ароматом, который имеется у садовых роз. В процессе селекции наиболее устойчивых сортов куда-то исчез запах!

Казалось бы, вернуть запах не так уж сложно. Найти соответствующий ген, трансформировать его в растение и... К сожалению, все не так просто.

Методы трансформации многих «немодельных» растений еще не разработаны, к их числу относятся и розы.

Часто лимитирующим фактором в биосинтезе тех или иных веществ служит количество прекурсора (молекулы-предшественника, из которой в одну или несколько стадий синтезируют конечный продукт). В таком случае избыточная экспрессия (оверэкспрессия) любого гена, участвующего в превращении прекурсора в продукт, не приводит к увеличению количества последнего (Dudareva *et al.*, 2000)

Биосинтез каждого компонента запаха — многоступенчатый процесс, осуществляемый различными ферментами. Поэтому внедрение в геном растения одного работающего гена чаще всего недостаточно для изменения запаха в целом. Иногда, даже имея дело с одноступенчатым биохимическим превращением, не удается достичь желаемого эффекта. Например, монотерпен линалол образуется из изопрена под действием фермента линалол-монотерпенсазы и является одним из важных компонентов запаха. Внедрение в геном петунии гена линалол-монотерпенсазы не привело к изменению содержания линалола выделяемого растением. Оказалось, что линалол образуется, но претерпевает реакцию модификации (гликозилирования), а гликозилированный линалол не является летучим (Lucke *et al.*, 2001). В запахе гвоздики, трансформированной тем же геном, количество линалола повысилось и составило 10% от общего количества выделяемых ЛВ. Однако, на «обонятельном восприятии» запаха наличие этого нового компонента никак не отразилось (Lavy *et al.*, 2002).

То же произошло и с геном — сесквитерпенсазой гермакрена-Д, — клонированным из роз и трансформированным в петунию. В цветках петунии дикого типа присутствует природный гермакрен Д, что подтверждает наличие необходимого субстрата. Однако у трансформированных растений не было обнаружено значимого увеличения концентрации выделяемого гермакрена Д.

Оверэкспрессия в петунии другого гена, клонированного из роз, ацетилтрансферазы (фермента, преобразующего спирт в ацетат), позволила изменить содержание ацетатов в запахе трансформированных растений (Guterman *et al.*, 2006).

Более детальное изучение путей образования компонентов запаха, а также их взаимосвязи

Возрождение запаха

с другими биохимическими процессами (первичного и вторичного метаболизма), происходящими в клетках, позволит в будущем более направленно воздействовать не только на запах, но и на другие свойства растений. К настоящему моменту довольно большие успехи достигнуты, например, в изучении метаболизма терпенов (Aharoni *et al.*, 2005).



Рисунок 1. Роза не как объект исследования, а как подарок.

Литература

Dudareva N., Murfit L., Mann C., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C., Bonham C., Wood K. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers // *Plant Cell*, 12: 949–962.

Lucker J., Bouwmeester J., Schwab W., Blaas J., van der Plas L., Verhoeven H. 2001. Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside // *Plant J.*, 27: 315–324.

Lavy M., Zuker A., Larkov O., Ravid U., Lewinsohn E., Vainstein A., Weiss D. 2002. Linalool and linalool oxide production in

transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool-synthase gene // *Mol. Breed.*, 9: 103–111.

Guterman I., Masci T., Chen X., Negre F., Pichersky E., Dudareva N., Weiss D., Vainstein A. 2006. Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers // *Plant Mol Biol.*, 60: 555–563.

Aharoni A., Jongsma M., Bouwmeester H. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants // *TRENDS in Plant Science*, 10: 594–602.